



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 41 27 790 A 1**

⑳ Aktenzeichen: P 41 27 790.2
㉔ Anmeldetag: 22. 8. 91
㉕ Offenlegungstag: 25. 2. 93

⑤① Int. Cl.⁵:
C 07 K 5/08
C 07 K 5/10
C 07 K 7/06
C 07 C 55/10
C 07 C 55/14
C 07 C 59/265
C 07 C 59/105
C 07 D 239/557
A 61 K 7/48

DE 41 27 790 A 1

⑦① Anmelder:
Wank, Anna, 1000 Berlin, DE

⑦④ Vertreter:
Ruschke, O., Dipl.-Ing., 1000 Berlin; Ruschke, H.,
Dipl.-Ing., Pat.-Anwälte, 8000 München

⑦② Erfinder:
Antrag auf Nichtnennung

⑤④ Verwendung von Oligopeptiden mit 2 bis 5 Peptidbindungen für kosmetische Zwecke und einige neue Oligopeptid-Metallkomplexe

⑤⑦ Verwendung von Oligopeptiden mit drei bis sechs Aminosäure-Verknüpfungen und mit Aminosäuren aus der nachstehenden Gruppe:
Glycin, Hydroxyprolin, Prolin, Arginin, Lysin, Hydroxylysin und Histidin.
für kosmetische Formulierungen zur Hautpflege, Hautkonditionierung und Verbesserung des Hautzustandes sowie einige neue Oligopeptid-Metallkomplex-Verbindungen, die hierfür besonders geeignet sind.

DE 41 27 790 A 1

BEST AVAILABLE COPY

Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Verwendung bestimmter Oligopeptide, deren Salze, insbesondere deren Halogenide, und deren Metallkomplexe für kosmetische Formulierungen, die allgemein der kosmetischen Hautbehandlung wie Hautpflege, Hautkonditionierung, zum Beispiel unter Verbesserung des Feuchtigkeitshaltevermögens, und zur sonstigen, vorwiegend nicht-medizinischen Verbesserung des Hautzustandes dienen. Die Erfindung bezieht sich außerdem auf einige neue Oligopeptid-Metallkomplexe, die bei den vorstehend genannten Anwendungen eine besondere Wirksamkeit entfalten.

Diese Oligopeptid-Aktivatoren sind als Additive in ansonsten bekannten kosmetischen Formulierungen wie Cremes, Salben, Pudern, Gelen, Lotionen, Wässern, Ölen, Sprays und dergleichen, selbst in sehr geringen Mengen, von außerordentlich hoher Wirksamkeit, indem durch ihre Anwesenheit die Wirkung bzw. die Wirkungsrichtung des Kosmetikums merklich verbessert werden kann. Die erfindungsgemäß verwendeten Oligopeptid-Aktivatoren sind peptidartig in der Natur als Sequenz von Proteinen gebunden, die in den Kollagenen, Bindegeweben, Elastinen, Keratinen, Fibronectinen und in anderen Stützproteinen vorkommen; zum Sequenzaufbau siehe R. Fleischmayer, B.R.Olsen, K. Kühn in *Structure, Molecular Biology and Pathology of Collagen*, Annals of the New York Academy of Science, Band 580, 1990.

Kollagene sind weitverbreitet auftretende Skleroproteine, die je nach Herkunft einen unterschiedlichen Aufbau zeigen. Bis heute kennt man die Typen I bis XI, wobei als Kollagene der Haut insbesondere die Typen I und III nachgewiesen worden sind. Kollagene sind aufgrund ihrer günstigen Eigenschaften häufig verwendete Bestandteile von Mitteln zur Hautbehandlung. Aufgrund seines hohen Wasserbindungsvermögens beeinflusst das Kollagen die Feuchtigkeitsregulierung der Haut positiv, es führt außerdem zur Glättung der Haut, stimuliert das Fibroblastenwachstum und die Wundheilung. Zahlreiche Kosmetika sind bekannt, die Kollagen in nativer Form (siehe DE-OS 20 64 604) oder auch in gezielt abgewandelter Form (siehe DE-OS 39 37 076) enthalten. Der Strukturaufbau des Kollagens ist durch die Aminosäure Glycin bestimmt, die in der Region der Helices in jeder dritten Position steht und maßgeblich für die spezielle, eng gewundene Kollagenhelix verantwortlich ist. Auch die Aminosäuren Prolin und Hydroxyprolin sind in relativ hohen Anteilen enthalten. Bei der Hydrolyse des Kollagens (enzymatisch oder in Gegenwart von Säuren) entstehen die Kollagen-Abbauprodukte Gelatine und Glutin. Die als Abbauprodukte aufzufassenden Peptide des Kollagens sind insbesondere bei Verknüpfung nur weniger Aminosäuren (bis zu den Dekapeptiden) ziemlich instabil, so daß es höchst zweifelhaft ist, ob Kollagenhydrolysate überhaupt nachweisbare Mengen an bestimmten Oligopeptiden wie Tri-, Tetra-, Penta- und Hexapeptiden aufweisen.

Im Zuge der vorliegenden Erfindung ist jedoch gefunden worden, daß gerade derartige Oligopeptide in kosmetischen Formulierungen für deren spezifische Eigenschaften verantwortlich sind.

Soweit bekannt, hat man bisher noch nicht versucht, das Wirkungsprofil und Wirkungsspektrum von kosmetischen Formulierungen dadurch zu beeinflussen und zu verbessern, daß bestimmte Niederpeptid-Verbindungen mit Molekulargewichten unter 1000 und vorzugsweise unter 500 als Wirkstoffadditive zur Hautbehandlung, Hautkonditionierung und Hautverbesserung verwendet wurden.

Es ist bekannt, daß einige Tripeptide in der Neurobiochemie, im Stoffwechsel und als Releasing-Hormone sehr spezifische Wirkungen entfalten. Genannt seien hier Thyroliberin, das sich aus Pyroglutaminsäure, Histidin und Prolinamid zusammensetzt, und Glutathion, γ -L-Glutamyl-L-cystein-glycin. In FEB Letters 238 (1988), S. 343-346, wird berichtet, daß die Kollagensynthese in Fibroblasten-Kulturen durch einen Tripeptid-Kupfer-Komplex des Glycidyl-L-histidyl-L-lysins stimuliert wird und eine physiologische Rolle bei der Wundheilung spielt. Das Tripeptid ist aus Humanplasma isoliert worden. Während das Tripeptid GHK auf medizinischem Sektor für eine Reihe von Anwendungen vorgeschlagen worden ist, war seine Verwendung im kosmetischen Bereich bisher nicht bekannt.

Der Sequenzaufbau unterschiedlicher Proteine und insbesondere derjenige von Stützproteinen zeigt trotz mannigfacher Unterschiede einzelne reguläre Eigentümlichkeiten, die uU bedeutsam sein können für den Eigenschaftszuschnitt dieser Proteine. So findet sich die oben erwähnte Tripeptidsequenz GHK nur in insgesamt acht Humanproteinen, allerdings von Proteinen mit herausragender Bedeutung, u. a. sind dies die Humankollagen $\alpha 2(1)$ -Kette, die Fibrin- α -Kette, der Blutgerinnungsfaktor XI und Interleukin 4 (siehe R. Fleischmayer, B.R.Olsen, K. Kühn in *Structure, Molecular Biology and Pathology of Collagen*, Annals of the New York Academy of Science, Bd. 580 (1990)).

Der vorliegenden Erfindung liegt als Aufgabe zu Grunde, eine gezielte Wirkungsverbesserung in kosmetischen Formulierungen mit einem an Naturstoffproteinen orientierten niedermolekularen Additiv zu erreichen, bei dessen Einsatz auf mannigfache Begleit- und Belastungskomponenten aus dem originären Naturstoff verzichtet werden kann. Dabei wurde der Zugang zu einer Formulierung angestrebt, in der das Wirkstoffadditiv für die Dauer der Aufbewahrung und Anwendung stabil bleibt und nicht durch Abbau der Molekülstruktur in seinem Wirkungsprofil eingeschränkt bzw. ganz inhibiert wird.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß bestimmte Oligopeptide der im Anspruch 1 definierten Formeln

$A - x - I$ oder $A - x - I - Y$

worin A, X, I und Y wie in Anspruch 1 definiert sind, mit Aminosäurebausteinen aus der Gruppe:

Glycin, Hydroxyprolin, Prolin, Arginin, Lysin, Hydroxylysin und Histidin,

in kosmetischen Formulierungen ausgezeichnete Wirkstoffadditive sind, wenn die Verknüpfung der Aminosäurebausteine dem Triplett-Aufbauprinzip im nativen Kollagen, Elastin, Keratin, Fibronectin bzw. Bindegewebe folgt. Eine besonders günstige Triplett-Struktur aus der definitionsgemäßen Gruppe findet sich nicht nur in den vorgenannten Stützproteinen, sondern auch im Interleukin 4.

Bei den erfindungsgemäßen Tripletteten, die insgesamt 3 bis 6 Aminosäure-Bausteine enthalten können, ist eine

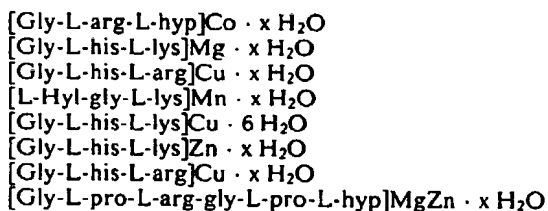
der Aminosäuren A, X, I bzw. A, X, I, Y das Glycin (G), wobei G mittel- oder endständig verknüpft sein kann. Bevorzugt enthält das verwendete Oligopeptid neben Glycin (G) auch Prolin (P) und/oder Hydroxyprolin. Dabei dürfte den Aminosäuren Pro und Hyp im Oligopeptid-Verbund möglicherweise zusätzlich die spezifische Funktion einer Schleuse oder Penetrationsschiene zukommen, die für die Haut-Tiefenwirkung der erfindungsgemäß zugänglich werdenden Präparate mitverantwortlich ist.

Diese Tiefenwirkung würde auch die vorteilhafte Kombinierbarkeit und Effektivität der bezeichneten Oligopeptide mit lokal, topisch oder subkutan applizierbaren pharmazeutischen Wirksubstanzen (z. B. bekannter Herkunft und Konfektionierung) erklären.

In den kosmetischen Formulierungen wird das Oligopeptid im allgemeinen in Mengen von mindestens $0,5 \cdot 10^{-5}$ ppm verwendet. Mengen bis zu 0,5 bis 0,75 Gramm — hier jeweils bezogen auf 100 g Gewicht der Endformulierung — sind anwendbar. Bevorzugt werden etwa 5 bis 5000 ppm und insbesondere 25 bis 2500 ppm. Zur Metallkomplexbildung befähigte Oligopeptide, beispielsweise solche mit Einheiten des Histidins oder Hydroxyprolins, sind günstig als Metall-Peptid-Komplex einsetzbar. Diese Metallchelate-Verbindungen sind meistens 2:1-Komplexe, 1:1-Komplexe oder 1:2-Komplexe, bei den höheren Oligopeptiden wie Penta- und Hexapeptiden kann der 2:1-Wert zugunsten des Metallanteils überschritten werden. Das bevorzugte Verhältnis in der Gesamtbilanz aus unterschiedlichen Komplexen und freien Oligopeptiden liegt im Bereich von etwa 0,4:1 bis 6:1, ausgedrückt als Peptid-Molekulargewicht/Metallatomgewicht. Das Mol/Atomgewichtsverhältnis kann größer als 2,0 und kleiner als 0,5 sein; Werte von 2,0 bis 0,5 sind jedoch bevorzugt.

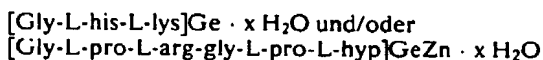
Es hat sich gezeigt, daß die Metall-Peptid-Komplexe nicht in jedem Fall isoliert werden müssen. Sie können auch in-situ bzw. innerhalb eines allgemeinen Compoundierungsansatzes vorgegeben werden. So können auch Kombinationen der Oligopeptide mit geeigneten Metallsalzlösungen wie z. B. Manganacetat, Magnesiumorotat, Kupfersuccinat und dergl. in stöchiometrischen oder auch in nichtstöchiometrischen Verhältnissen Verwendung finden.

Als besonders geeignete Metallionen werden bevorzugt: Mangan, Magnesium, Kupfer, Eisen, Nickel, Zink, Germanium, Molybdän und Kobalt. Beispiele für einige spezielle 1:1-Komplexe sind:



Der Hydratanteil x schwankt meistens zwischen 1 H₂O und 6 H₂O. Die isolierten Metallkomplexsalze sind teilweise gutkristallisierende Verbindungen. Ihre allgemeine Herstellung wird nachfolgend beschrieben.

Erfindungsgemäß sind die Komplexverbindungen mit Germanium als besonders interessant erkannt worden, z. B.



In einer besonders geeigneten und deshalb bevorzugten Gruppe von Oligopeptiden sind eine oder mehrere basische Aminosäuren peptidartig verknüpft; diese Oligopeptide können auch als Salze mit anorganischen Säuren wie HCl oder Phosphorsäure oder mit organischen Säuren, wie z. B. Citronensäure, Ascorbinsäure, Bernsteinsäure, compoundiert werden, wovon die Succinate, Orotate, Citrate, Adipate, Phosphate, Gluconate und die Halogenide wie Bromide und Chloride bevorzugt sind. Sowohl vollständige Salzbildung als auch partielle Salzbildung ist möglich. Prolin und Hydroxyprolin sind gleichfalls als salzbildende Aminosäurebestandteile günstig.

Für die Wirkungsaktivität der Oligopeptide in üblichen kosmetischen Formulierungen könnte eine aus dem medizinischen Sektor bekannte steuernde bzw. aktivierende Funktion maßgeblich sein, ohne daß hier eine Festlegung auf eine bestimmte Theorie beabsichtigt ist.

Überraschenderweise hat auch das Molekulargewicht des Oligopeptids eine erhebliche Bedeutung, was für den hier in Betracht kommenden Anwendungsbereich der Kosmetik wiederum auf einen spezifischen Penetrationszuschnitt schließen läßt. Tripeptid-Sequenzen der allgemeinen Formel des Anspruchs 1 und insbesondere solche mit Molekulargewichten von etwa 350 bis 480 und bevorzugt solche mit einem Molekulargewicht im engeren Bereich von etwa 370 bis 450 sind besonders wirksam. Das Molekulargewicht versteht sich jeweils ohne Metall, aber einschließlich des Anions im Falle einer Salzbildung.

Beispiele für erfindungsgemäß geeignete Tripeptide sind Gly-prohyp, Gly-arg-hyp, Gly-pro-lys, Gly-his-his, Gly-lys-arg, Gly-pro-arg, Arg-gly-his, Arg-gly-pro, Gly-pro-pro, Gly-gly-lys, Arg-gly-arg, Gly-lys-hyp, Lys-gly-pro, Arg-gly-pro, Gly-his-lys, Gly-his-arg, Gly-arg-hyp, Hyl-gly-lys, Gly-his-arg, Hyp-gly-pro.

Beispiele für Tetrapeptide, Pentapeptide und Hexapeptide werden im folgenden genannt:

Tetrapeptide: Gly-pro-lys-gly, Gly-his-lys-gly, Hyp-gly-his-lys, Gly-his-his-gly, Gly-pro-hyp-gly, Hyl-gly-his-arg, Gly-his-arg-gly, Gly-arg-hyp-gly, Arg-gly-his-lys, Hyl-gly-pro-lys;

Pentapeptide: Hyp-gly-his-lys-gly, Hyp-gly-lys-hyp-gly, Gly-pro-lys-gly-pro;

Hexapeptide: Gly-pro-arg-gly-pro-hyp, Gly-his-hyp-gly-lys-pro, Gly-lys-pro-gly-arg-hyp, Gly-pro-hyp-gly-pro-pro, Gly-his-arg-gly-his-lys.

Von den vorgenannten Oligopeptiden sind insbesondere die Arg, His und/oder Lys bzw. Hyl enthaltenden Verbindungen bevorzugt, speziell wenn sie als Metallion-Ligand fungieren.

Eine Reihe der Oligopeptide sind im Handel erhältlich. Sie können aber auch durch Methoden der enzymatischen Hydrolyse bzw. Hydrolyse in Gegenwart von H^+ -Ionen erhalten werden. Eine geeignete Methode zur Anreicherung der Oligopeptid-Sequenzen in einem Ausgangsprotein oder Ausgangs-peptid besteht in der gentechnisch induzierten Insertion bestimmter Aminosäuren in einem Naturstoff, der dann entsprechend hydrolysiert wird.

Die kosmetischen Formulierungen der Erfindung werden in an sich bekannter Weise unter Zusatz der Oligopeptide komprimiert. Besonders günstige Formulierungen ergeben sich, wenn das Tripeptid zusammen mit freien Aminosäuren und/oder Gelatinepeptonen verwendet wird.

Eine spezielle Anwendbarkeit besteht darin, daß die Oligopeptide zusammen mit einer gärungssteigernde Zellpräparation auf Pflanzenbasis aus partiell dehydratisierten und nicht mehr vermehrungsfähigen Pflanzenzellen kombiniert werden, die den anaeroben Glucoseabbau um mindestens 50% steigert und vorzugsweise ein Salz mit einem Kation von einem Ionenradius von höchstens 1,33 Å enthält. Der Salzgehalt dieser Zellpräparation beträgt am besten etwa 0,2 bis 4,5 Gew.-%, wobei ein Salzgemisch mit Kationen aus der Gruppe: Na, Mg und Mn und hierbei ein Verhältnis von Mg/Na von etwa 0,05:1 bis 0,2:1 und ein Verhältnis für Mn/Mg von etwa 1:25 bis 1:10 recht günstig ist.

Als weitere Zusätze zu dieser Oligopeptid/Pflanzenzell-Kombination kommen Monosaccharide, Disaccharide, mehrwertige Alkohole und deren Oxidationsprodukte (Aldehyde, Säuren) und deren Gemische in Betracht. Geeignete Pflanzenzellmaterialien sind Samen-, Keim- und Fruchtzellen sowie Zellen von Pilzen und Algen, insbesondere von Saccharomycetaceae. Diese Pflanzenzell-Additive für die erfindungsgemäßen Oligopeptide, deren Salze und/oder deren Metallkomplexe werden zweckmäßigerweise so hergestellt, daß die vermehrungsfähigen Ausgangs-Pflanzenzellen mit ihrem vollständigen intrazellulären Wassergehalt mit mindestens einem Salz aus den vorgenannten Gruppen versetzt, das Gemisch weitgehend homogenisiert und einer Wärmeeinwirkung unterzogen wird, wodurch Intrazellularwasser aus den Zellen bis zu einem Gehalt von etwa 10 bis 75%, bezogen auf 100% Ausgangswassergehalt, extrahiert wird.

Wenn die erfindungsgemäß verwendeten Oligopeptide oder Oligopeptidfraktionen aus Naturstoffen wie den erwähnten Stützproteinen hergestellt werden, wird beispielsweise ein Ausgangskollagen (z. B. Kalbshautkollagen, lösliches natives Kollagen, Kollagen Typ I oder III, Atelokollagen, Gelatine, Gelatinepeptone) in geeigneter Weise in Lösung gebracht, gegebenenfalls derivatisiert durch Behandeln mit einer Chemikalie wie H_2O_2 , und dann in 0,1- bis 1%iger wäßriger Phase in Gegenwart von Salzsäure hydrolysiert. Die üblichen Methoden der Dialyse, Aussalzung und präparativen Chromatographie ermöglichen die Isolierung einzelner Oligopeptide oder Oligopeptidgruppen.

Die Tri-, Tetra-, Penta- und Hexapeptide können auch nach den üblichen Methoden der Peptidsynthese (z. B. nach Merrifield) hergestellt werden, insbesondere dann, wenn struktureinheitliche Verbindungen und deren Metallkomplexe angestrebt werden.

Die Herstellung der Oligopeptid-Metall-Komplexe nutzt die große Affinität von basischen Aminosäuren (wie Histidin, Lysin, aber auch Prolin und Hydroxyprolin) für komplexbildende Metallionen. So wird der Gly-his-lys-Kupfer-Komplex wie bei L. Pickart, St. Lovejoy in "Biological Activity of Human Plasma Copper-Binding Growth Factor Glycyl-L-histidyl-L-lysin", Methods in Enzymology, Bd. 147, S. 314 ff., beschrieben, gewonnen. Allgemein werden auf molarer oder äquivalenter Basis das Oligopeptid und das Metallacetat oder Metallsuccinat zusammengegeben und neutralisiert. Der Metallkomplex wird in wäßriger Lösung säulenchromatographisch gereinigt und über spektrometrische Verfolgung des Eluats isoliert. Der reine Metallkomplex ist meistens erhältlich in kristalliner Form, wenn das Oligopeptid in der wäßrigen Metallacetatlösung gelöst und dann Ethanol zugesetzt wird, wonach sich meistens gut kristallisierbare Feststoffe abscheiden.

Überraschenderweise sind die hier verwendeten Oligopeptide hautaktive Komponenten für kosmetische Formulierungen, wie die im folgenden beschriebene Bestimmung der Hautrauhigkeit einer Tripeptidhaltigen Formulierung nach der Padberg-Methode zeigt: Eingesetzt wurden Wasser/Öl-Emulsionen, denen (1) das Tripeptid Gly-L-his-L-lys und (2) Gly-L-his-L-lys/Gly-L-lys-L-hyp/Gly-L-his-L-his als Oligopeptid zugesetzt wurde. Zum Vergleich diente ein Placebo ohne Tripeptid-Zusatz.

Für den Test wurden 10 Probandinnen im Alter von 40 bis 66 Jahren herangezogen. Die Versuchspersonen stellten sich freiwillig für diesen Test zur Verfügung. Sie wurden angewiesen, drei Tage vor Beginn des Tests und während der gesamten Testdauer keine anderen Kosmetika auf den Testarealen (der Unterarme) zu verwenden. Bei jeder Probandin wurden sechs Testfelder auf beiden Unterarm-Innenseiten (also drei je Arm) markiert. Die Areale waren so zugewiesen, daß die Produkte gleich häufig bei den zehn Probandinnen auf die sechs Testfelder verteilt waren (gleichförmige Permutation). Neben den fünf Emulsionen wurde ein Leerfeld mitgeprüft. Nachdem die Leerwerte aller Areale nach beiden Methoden bestimmt waren, wendeten die Probandinnen die Produkte selbst zu Hause in einem Zeitraum von 14 Tagen morgens und abends an. Danach wurde 4 Stunden nach der letzten Anwendung erneut mit der Bildanalyse und nach Padberg geprüft.

Padbergmethode

Im Padberg-Test wird die Rauigkeit einer Haut anhand derjenigen Menge Methylenblau bewertet, die in Abhängigkeit von den Hautkonditionen von der Haut absorbiert wird. Studien mit "subjektiv rauher Haut" bzw. mit "durch Tenside geschädigter Haut" ergaben, daß die absorbierte Methylenblau-Menge der Hautrauhigkeit proportional ist. Gute Haut bzw. gut gepflegte Haut absorbiert demgegenüber nur eine geringe Menge Methylenblau.

Zur Durchführung des Padberg-Tests werden folgende Schritte angewendet:

- (1) Markierung der Testfelder
 - (2) Vorbehandlung der Testfelder mit einer 1%igen Lösung eines nichtionischen Tensids in Wasser
 - (3) Nachwaschen mit Leitungswasser von 35°C
 - (4) Abtupfen der Testfelder
 - (5) Danach 30minütiges Einklimatisieren der Probanden bei 22°C und 60% relativer Luftfeuchte
 - (6) Auftragen von 20 µl Farblösung (die Farblösung besteht aus 0,5%igem Methylenblau (20%)) und 80% einer 1%igen Lösung eines nichtionischen Tensids.
 - (7) Antrocknenlassen der Farbe für 30 s.
 - (8) Entfernen des Farbüberschusses mit 2 ml einer 0,25%igen nichtionischen Tensidlösung
 - (9) Extraktion mit 2 x 2 ml einer Mischung aus:
 - 2,0% Natriumlaurylsulfat
 - 48,0% Wasser
 - 50,0% Isopropylalkohol
 jeweils nach 60 s.
 - (10) Messen des Eluats im Spektralphotometer bei 660 nm gegen Luft
 - (11) Ergebnis = Extinktion Haut (Ausgangswert)
 - (12) Es erfolgte nun die Ausgabe der Produkte mit der Anweisung, diese 14 Tage lang morgens und abends auf den vorgesehenen markierten Stellen aufzutragen. Zuvor wurde sichergestellt, daß 3 Tage vor Beginn der Prüfung und während der gesamten Prüfdauer keine anderen kosmetischen Produkte auf den Testarealen angewendet wurden.
 - (13) Wiederholung der Schritte (1) bis (9) am 15. Tag. Die letzte Anwendung vor dem Test erfolgte 4 Stunden zuvor.
- Ergebnis = Extinktion nach der Anwendung
- (14) $\frac{\text{Extinktion nach Anwendung}}{\text{Extinktion Hautausgangswert}} \times 100 = \text{Rauhigkeit (\%)}$

Diskussion der Padbergmethode

Die Padbergmethode liefert Daten über die Adsorption von Methylenblau auf der Haut. Je nach Hautzustand stehen dem Farbstoff mehr oder weniger Bindungsstellen auf der Haut zur Verfügung. Jahrelange Erfahrungen haben immer wieder bestätigt, daß subjektiv "raue" Haut oder beispielsweise durch Detergenzien geschädigte Haut mehr Bindungsstellen für Methylenblau aufweist, und zwar in Abhängigkeit vom Schädigungsgrad. Umgekehrt zeigt eine mit Cremes verbesserte Haut eine Abnahme der Bindungsstellen, und zwar proportional zur Anwendungsdauer. Die Differenzierung bei verschiedenen Produkten ist sehr gut und verläßlich; auch hier wird stets eine Korrelierung mit der subjektiven Begutachtung erzielt. Bezüglich weiterer Einzelheiten siehe Journal of the Society of Cosmetic Chemists, Bd. 20 (1969), S. 719 – 728.

Ergebnisse des Padberg-Tests

Die Photometer-Werte, ausgedrückt in Prozent des Wertes bei behandelter Haut und bezogen auf den Ausgangszustand, sind in der folgenden Tabelle I zusammengefaßt. In der Tabelle sind auch die errechneten Mittelwerte angegeben.

Die Ergebnisse zeigen, daß mit den Testemulsionen eine Glättung der Haut erzielbar ist.

Tabelle I

Rauhigkeitstest nach der Padbergmethode mit Wasser/Öl-Emulsionen, mit und ohne Zusatz von Tripeptiden (Anwendungsdauer 14 Tage)

Alter der Probanden	Plazebo	Wasser-Öl-Emulsionen der 50 ppm Gly-L-his-L-lys	Erfindung 225 ppm Tripeptid*)
46	81,0	50,1	60,0
41	91,0	64,4	64,9
47	80,0	76,5	40,0
50	76,6	33,0	41,2
51	75,3	56,8	70,0
40	95,0	37,5	40,5
65	89,0	72,5	68,0
66	97,8	57,8	55,0
62	92,6	70,0	60,0
45	76,9	60,7	62,7
Mittelwerte:	85,5	58,0	56,2

*) bestehend aus je 75 ppm Gly-L-his-L-lys, Gly-L-his-L-hyp und Gly-L-his-L-his

Da die erfindungsgemäß verwendeten Oligopeptide nicht allzu beständig sind, erweist es sich als zweckmäßig und vorteilhaft, sie in den kosmetischen Formulierungen in verkapselter Form vorzulegen, so daß sie erst bei Applikation, z. B. durch Einreiben, freigesetzt werden. Das Prinzip der Verkapselung von Komponenten ist aus der Technik bekannt. Die Kapseln sind meistens Mikrokapseln und innerhalb der Matrix einer kosmetischen Grundlage wie einer Salbengrundlage fein dispergiert. Bei der Mikroverkapselung wird das Oligopeptid, der Oligopeptid-Metallkomplex bzw. das Oligopeptid-Salz durch Umhüllung mit filmbildenden Polymeren umgeben, die sich durch Koazervierung oder Grenzflächenpolymerisation oder durch einen anderen kapselbildenden Vorgang auf dem einzuhüllenden Material niederschlagen und eine feste Hülle bilden. Hierdurch wird nicht nur die Stabilität des Oligopeptid-Additivs gewährleistet, sondern auch generell die Compoundierung bei Herstellung der kosmetischen Formulierung ganz erheblich vereinfacht. Zum Stand der Technik siehe Sliwka, Angew. Chemie 87 (1975), S. 556 – 567.

Bei der Verkapselung durch Komplekkoazervierung nimmt man bevorzugt eine Gelatinelösung, vermischt sie mit einer Gummi-arabicum-Lösung und stellt den pH-Wert der verdünnten Lösung langsam auf etwa 4,5 ein. Gelatine ist ein amphoter Polymer mit einem isoelektrischen Punkt bei pH 8. Mit dem Ansäuern der Lösung läßt sich das Polymer positiv auf, so daß es zur Wechselwirkung mit dem stets negativ geladenen Gummi-arabicum kommt. Man arbeitet zunächst bei Temperaturen über 38°C, um eine Gelierung der Gelatine zu vermeiden. In der Praxis geht man beim Mikroverkapseln von Oligopeptiden folgendermaßen vor: In einem Rührkessel legt man die auf 45°C erwärmte Lösung des gelierbaren hydrophilen Polymers Gelatine vor, gibt eine ausreichende Menge Ethanol zu und emulgiert dann das Oligopeptid, den Oligopeptid-Metallkomplex bzw. das Oligopeptid-Metallkomplex-Gemisch bis zur gewünschten Teilchengröße (z. B. 37 µm). Anschließend gibt man die Gummi-arabicum-Lösung hinzu. Die Koazervierung tritt unter ständigem Rühren ein. Beim Abkühlen des Ansatzes von 45°C auf 10°C geliert das um die Kernphase abgeschiedene Gelatine/Gummi arabicum-Komplekkoazervat. Man versetzt mit Glutaraldehyd und härtet durch langsame Zugabe von NaOH, bis der pH-Wert von 8,5 bis 9,0 erreicht ist, durch.

Die Erfindung wird im folgenden anhand von mehreren nichtbeschränkenden Beispielen erläutert. Die in diesen Beispielen verwendeten Komponenten sind indes besonders bevorzugte Ausgestaltungen der Erfindung.

Beispiel 1

Nach folgender Vorschrift wurde eine Lanolin enthaltende Handcreme formuliert, in der als Oligopeptid-Aktivstoff das Magnesiumsalz des Gly-L-his-L-lys (1:1-Salzkomplex) inkorporiert wurde. Die Endzusammensetzung der Cremeformulierung war folgende:

Lösliches Lanolinderivat	1,0 Gew.-%
Acetylierte Lanolinalkohole	5,0 Gew.-%
flüssiger Multisterol-Extrakt	5,0 Gew.-%
Vaseline	5,0 Gew.-%
Polyvinylalkohol-Gel	0,75 Gew.-%
10%iges NaOH	2,25 Gew.-%
Gly-L-his-L-lys, 1 : 1-Magnesiumkomplex	0,5 Gew.-%
ethoxylierte Fettamine	3,75 Gew.-%
Parfümöl	0,3 Gew.-%
Wasser, bidest.	ad 100 Gew.-%

Zur Herstellung dieser Handcreme wurden die Fettphasen-Bestandteile und Vaseline auf ca. 75°C erwärmt. Gleichzeitig wurde das PVA-Gel in heißem Wasser von ca. 80°C dispergiert und allmählich gelöst. Zur letzteren Dispersion wurde das ethoxylierte Fettamin (mit ca. 25 EO-Einheiten) und ggf. noch ein Emulgator gegeben, wonach die vorher angesetzte erwärmte Fettphase darin emulgiert wurde. Nach 5 Minuten Rühren bei der Mischungstemperatur wurde auf 60°C abgekühlt, dann mit der 10%igen Natronlauge versetzt und weiter bis auf unter 40°C gekühlt. Unter langsamem Rühren wurden dann Gly-L-his-L-lys und Magnesiumgluconat sowie das Parfüm zugesetzt. Der Ansatz wurde gut homogenisiert. Die Handcreme war stabil konfektioniert und zeigte eine verbesserte Hautkonditionierung, verglichen mit einem Ansatz ohne Oligopeptid-Zusatz.

Ähnliche Resultate ergaben sich auch dann, wenn statt des Magnesiumgluconat sein Mangansalz (insbesondere Mangansuccinat oder Manganorotat) verwendet wurde.

Beispiel 2

Aus der folgenden Zusammensetzung wurde ein Baby-Shampoo hergestellt:

DE 41 27 790 A1

Sulfobernsteinsäure-halbest, Natriumsalz, verdünnt (Steinapol SBFA 30 und Steinapol SBZ)	700 g	
Alkylethersulfat	10 g	
Gly-L-his-L-lys (verkapselt mit Gelatine/Gummi arabicum)	5 g	
Oberflächenfett	10 g	5
Wasser	275 g	
Parfümöl	1,5 g	
Manganorotat	1,0 g	

Der pH-Wert der Mischung wurde auf einen Endwert von 6,5 eingestellt.

10

Beispiel 3

Eine Creme-Grundlage wurde wie folgt komponentiert:

15

Vaseline	40 Gew.-%	
Cetanol	18 Gew.-%	
Sorbitansesquioleat	5 Gew.-%	
Polyoxyethylenlaurylether	0,5 Gew.-%	20
p-Hydroxyalkylbenzoat	0,2 Gew.-%	
Gemisch aus Gly-L-his-L-lys und Gly-L-his-L-arg und Gly-L-his-L-arg-gly-L-his-L-lys (Molverhältnis 1 : 2 : 1)	0,4 Gew.-%	
Wasser	ad 100,00 Gew.-%	25

Beispiel 4

Um die Wirkung des folgenden Oligopeptid-Gemisches zu prüfen, wurde eine Öl-Wasser-Emulsion hergestellt aus

30

Glycerinmonostearat	130 g	
Cetiol (ungesättigte Fettsäureester aus Walrat)	110 g	
Mandelöl	90 g	
Glycerin	50 g	35
Wasser	500 g	
Testlösung	100 g	

Die Testlösung enthielt ca. 5 g eines Oligopeptid-Gemisches, bestehend aus Gly-L-his-L-lys, Gly-L-his-L-lys-gly und Gly-L-pro-L-pro (auf Molbasis 10 : 1 : 10) in Wasser.

40

Der Einfluß der Emulsion auf die Hauttemperatur wurde an 30 Probandinnen im Alter von 40 bis 60 Jahren mit trockener Haut getestet. Die Ergebnisse sind nachfolgend tabelliert.

Tabelle II

45

Temperatur (°C) vor Applikation	Öl-Wasser-Emulsion Typ	Temperatur (°C) nach Applikation	ΔT
30,6 — 33,0	Testemulsion	32,7 — 32,9	0,2
30,5 — 34,0	Kontrollemulsion — ohne Oligopeptid —	30,5 — 33,6	3,1

50

Ohne Oligopeptid-Zusatz konnte keine merkliche Stabilisierung der Hauttemperatur festgestellt werden.

55

Beispiel 5

Aus folgender Zusammensetzung wurde eine wirksam pflegende Hautlotion hergestellt.

60

Tripeptid (L-Lys-gly-L-pro)	0,5 g	
p-Hydroxybenzoesäurealkylester	0,15 g	
Ethanol	20 g	
Wasser	ad 100 g	65

Diese Hautlotion enthielt keinerlei Penetrationsmittel, da die Penetrationsförderung bereits durch das Oligo-

peptid bewirkt wurde.

Beispiel 6

Eine Creme-Grundlage wurde wie folgt komponentiert:

Cetanol	38 Gew.-%
Vaseline	16 Gew.-%
Sorbitansequioleat	4 Gew.-%
Polyoxyethylenlaurylether	0,5 Gew.-%
Gemisch monomerer Aminosäuren*)	3 Gew.-%
Tripeptidgemisch**)	0,2 Gew.-%
Wasser	ad 100,00 Gew.-%

*) Das Aminosäuregemisch enthielt

0,2 g Glycin
0,25 g L-Serin
0,05 g Asparagin
0,3 g L-Prolin
0,6 g L-Alanin
0,5 g L-Lysin
0,1 g L-Glutaminsäure
0,04 g L-Asparaginsäure
0,05 g L-Tyrosin
0,05 g L-Valin
0,1 g L-Hydroxylysin
0,06 g L-Ornithin
0,02 g Cystein
0,3 g L-Arginin

Vorstehende Aminosäuren wurden in Wasser gelöst, so daß sich 100 g Gesamtgewicht ergaben.

**) Das Tripeptidgemisch enthielt Gly-his-L-lys und Gly-L-his-L-pro in einem Verhältnis von 5 : 2.

Patentansprüche

1. Verwendung eines Oligopeptids mit 2 bis 5 Aminosäureverknüpfungen der allgemeinen Formeln

A-X-I und A-X-I-Y

worin A, X und I für gleiche oder verschiedene Aminosäurereste der nachstehend definierten Gruppe stehen und Y die Bedeutung von A, X, I; von A-X, X-I, A-I, X-A, I-X, I-A oder von A-X-I oder I-X-A hat, als Additiv für die Herstellung von kosmetischen Formulierungen zur Hautpflege, Hautkonditionierung und Hautzustandsverbesserung,

wobei A, X und I Aminosäurereste der Gruppe:

Glycin (Gly), Hydroxyprolin (Hyp), Prolin (Pro), Arginin (Arg), Lysin (Lys), Hydroxylysin (Hyl) und Histidin (His)

sind, die in hochmolekularer proteingebundener Form als Sequenz in natürlichen Kollagen-, Elastin-, Keratin-, Fibronektin- und/oder Bindegewebsproteinen vorkommen.

2. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei mindestens zwei unterschiedliche Oligopeptide der vorstehenden Formeln komponentiert sind.

3. Verwendung gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei die Tripeptid-Sequenz A-X-I ein mittleres Molekulargewicht im Bereich von etwa 350 bis 480 aufweist.

4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Tripeptid-Sequenz ein mittleres Molekulargewicht im Bereich von etwa 370 bis 450 aufweist.

5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der basische Anteil der Aminosäuren als HCl-Salz vorliegt.

6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Oligopeptide zumindest teilweise in Metallkomplexen gebunden sind.

7. Verwendung nach Anspruch 6, wobei der Metallkomplex als Metall(ion) ein Metall aus der Gruppe:

Mn, Mg, Cu, Fe, Ni, Zn, Ge, Mo und Co aufweist.

8. Verwendung nach Anspruch 6 oder 7, wobei das Metall-Aminosäure(AS)-Verhältnis durch eine Relation im Bereich von etwa 0,4:1 bis 1,6:1 und bevorzugt von etwa 0,8:1 bis 1,2:1, ausgedrückt als Atom- bzw. Molverhältnis von Metall(ion)/Tripeptid-Sequenz, eingestellt ist.

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das Oligopeptid in verkapselter Form inkorporiert ist.

10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei das Oligopeptid in einer Konzentration von mindestens 10 ppm angewendet wird.

11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Konzentration des Oligopeptids innerhalb eines Bereichs von etwa 20 ppm bis $7,5 \cdot 10^4$ ppm und insbesondere von 25 ppm bis $2,5 \cdot 10^4$ ppm der kosmetischen Endformulierung eingestellt ist.

12. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei das Oligopeptid zusammen mit monomeren Aminosäuren komponentiert ist.
13. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei das Oligopeptid zusammen mit Gelatinepeptonen oder mit anderen Peptonen oder Gemischen derselben komponentiert ist.
14. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei das Oligopeptid mindestens teilweise von Glycyl-L-histidyl-L-lysin, einem Metallkomplex desselben und/oder einem Salz desselben gestellt wird. 5
15. Glycyl-L-histidyl-L-lysin-Magnesium-Komplex.
16. Glycyl-L-histidyl-L-lysin-Mangan-Komplex.
17. Glycyl-L-histidyl-L-lysin-Zink-Komplex.
18. Glycyl-L-histidyl-L-lysin-Germanium-Komplex. 10
19. Komplexverbindung nach einem der Ansprüche 15 bis 18, mit einem Tripeptid-Metall-Verhältnis von etwa 0,4:1 bis 61:1 und bevorzugt von etwa 0,8:1 bis 1,2:1.
20. Tetrapeptid der allgemeinen Formel
M-O-S
oder ein Salz desselben mit einer nichttoxischen Säure worin M für die Dipeptidsequenz Gly-L-his, L-Hyp- 15
gly oder L-Arg-gly steht, O einer der Aminosäurebausteine: L-Lys, L-His, L-Arg, L-Pro ist und S einer der Aminosäurereste Gly oder L-Lys ist, mit der Maßgabe, daß zwischen zwei Resten Gly mindestens zwei Nicht-Gly-Reste gebunden sind.
21. Tetrapeptid nach Anspruch 20 in Form eines Metallkomplexes mit Mg, Mn, Cu, Zn, Ge, Ni, Fe, Mo oder Co in einem Verhältnis von etwa 0,4:1 bis 6:1 und vorzugsweise von etwa 0,8:1 bis 1,2:1 -ausgedrückt als 20
Tripeptidsequenz-Metall-Molverhältnis.
22. Pentapeptid der Formeln
L-Hyp-gly-L-lys-L-hyp-gly
L-Hyp-gly-L-his-L-lys-gly
Gly-L-pro-L-lys-gly-L-pro 25
Salze derselben mit einer nichttoxischen Säure und Metallkomplexe derselben mit Metallen aus der Gruppe: Mg, Mn, Cu, Zn, Ge, Ni, Fe, Mo und Co, entsprechend einem Tripeptidsequenz-Metall-Molverhältnis von etwa 0,8:1 bis 1,2:1.
23. Hexapeptid der Formeln
Gly-L-pro-L-arg-gly-L-pro-L-hyp 30
Gly-L-his-L-hyp-gly-L-lys-L-pro
Gly-L-lys-L-progly-L-arg-L-hyp
Gly-L-pro-L-hypgly-L-pro-L-prof
Gly-L-his-L-arg-gly-L-his-L-lys
Salze derselben mit einer nichttoxischen Säure und Metallkomplexe derselben mit Metallen aus der Gruppe: 35
Mg, Mn, Cu, Zn, Ge, Ni, Fe, Mo und Co, entsprechend einem Tripeptidsequenz/Metall-Molverhältnis von etwa 0,8:1 bis 1,2:1.
24. Oligopeptid der Ansprüche 21 bis 23, wobei das Anion der Salze aus der Gruppe: Bernsteinsäure, Adipinsäure, Orotsäure, Citronensäure, Gluconsäure und Phosphorsäure, ausgewählt ist. 40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.